

Veleučilište u Karlovcu
Stručni studij prehrambene tehnologije
Pivarstvo

Ivana Horvat

**Utjecaj temperature skladištenja na promjenu aromatskog profila
jabuke sorte „Zlatni Delišes“**

Završni rad

U Karlovcu, rujan, 2017.

Veleučilište u Karlovcu
Stručni studij prehrambene tehnologije
Pivarstvo

Ivana Horvat

**Utjecaj temperature skladištenja na promjenu aromatskog profila
jabuke sorte „Zlatni Delišes“**

Završni rad

Mentor: Sandra Zavadlav, dipl. ing.

Broj indeksa studentice: 0314614075/PT

U Karlovcu, rujan, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za prehrano na Katedri za tehnologije, prehrano in vino, Oddelek za živilstvo, Biotehniške fakultete Sveučilišta u Ljubljani pod mentorstvom izv. prof. dr. Rajka Vidriha, te mentorstvom Sandre Zavadlav, dipl. ing, na Veleučilištu u Karlovcu, stručni studij Prehrambene tehnologije.

PREDGOVOR

Zahvaljujem se mentorici Sandra Zavadlav, dipl. ing. na podršci i povjerenju koje ste imali u mene kada ni sama u to nisam vjerovala. Hvala Vam na bezrezervnom trudu i mnogobrojnim savjetima, bez kojih ovaj Završni rad sigurno nikad ne bi uspjela završiti, najviše Vam hvala na tome što se ste mi vratili vjeru u sebe, te želju i volju za nastavkom studiranja.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Rajko Vidrihu, dr. Emil Zlatiću, na pruženoj prilici da sudjelujem na Vašem istraživanju na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani i, što je još važnije, upoznam osobe od kojih sam puno naučila i na čiju sam pomoć uvijek mogla račun

Posebno se zahvaljujem Doris Kokalj i Andreju Živkoviću na nesebičnoj pomoći, strpljenju i vremenu koje ste našli za mene. Razgovori s Vama puno su mi pomogli u zaokruživanju mog Diplomskog rada.

Zahvaljujem se cijeloj mojoj obitelji, a ponajviše ujaku što me je uvijek podržavao i usmjeravao na pravi put.

Najviše se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu, šogorici i nećacima kojima i posvećujem ovaj Diplomski rad. Hvala Vam na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi. Hvala Vam na svakom razgovoru i potpori i što ste uvijek bili tu uz mene bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima, jer bez Vas sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće.

Hvala svim mojim prijateljima i dragim ljudima koji su mi najljepše godine odrastanja učinili nezaboravnima. Hvala Vam na zajedničkim trenucima, iskustvima i razgovorima koji su od mene načinili osobu.

Velika hvala svima!

UTJECAJ TEMPERATURE SKLADIŠTENJA NA PROMJENU AROMATSKOG PROFILA JABUKE SORTE “ZLATNI DELIŠES”

SAŽETAK

Predmetno istraživanje provodilo se na jabukama sorte „Zlatni Delišeš“ koje su bile skladištene u ULO hladnjačama pri Laboratoriju za prehrano, Katedre za tehnologiju, prehrano in vino, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta Sveučilište u Ljubljani. Referentni uzorak od 120 kg jabuka raspoređen je u četiri ULO hladnjače u kojima je bila uspostavljena kontrolirana atmosfera. Svaka hladnjača sadržavala je 30 kg jabuka. Na fakultetu praćeno je dozrijevanje ploda na tri temperature skladištenja 4°C, 8°C i 12°C, dok je temperatura od 20°C bila namijenjena za simulaciju uvjeta skladištenja na trgovinskim policama, relativna vlaga (RH) u hladnjačama održavana je između 75% do 80%, osim u uvjetima skladištenja na 20°C gdje se relativna vlaga održavala između 50% do 60%. Svaki drugi dan, kao uzorak, koristilo se 10 plodova sa svake temperature, te se na njima mjerila čvrstoća putem analizatora za teksturu voća i povrća, postotak suhe tvari putem digitalnog refraktometra i pripremali su se uzorci za arome i šećere.

Ključne riječi: aroma, jabuka, kontrolirana atmosfera, ULO hladnjače.

HOW STORAGE TEMPERATURE EFFECTS ON CHANGES IN AROMA PROFILE OF APPLES „GOLDEN DELICIOUS“

ABSTRACT

The research was carried out on apples of the „Golden Delicious“ variety that were stored in ULO refrigerators at the Food Laboratory, chair of Plant Food Technologies, Human Nutrition and Enology, Department of Food Science and Nutrition, Biotechnical Faculty University of Ljubljana. A reference sample of 120 kg of apples was deployed in four ULO refrigerators, in which was established controlled atmosphere. Each refrigerator contained 30 kg of apples. Fruit ripening was monitored at three different storage temperatures 4°C, 8°C and 12°C, while the temperature of 20⁰C was intended to stimulate the storage conditions at the store shelves. Relative humidity (RH) in refrigerators was maintained between 75% and 80%, except for storage conditions at 20⁰C, where relative humidity maintained between 50% and 60%. Ten samples of apples from each storage temperature where sampled every other day, and measured their strength by fruit and vegetable texture analyzer, a percentage of dry matter by a digital refractometer and prepared a samples for aromas and sugars.

Keywords: apple, aroma, controlled atmosphere, ULO refrigerator.

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. POVIJEST SORTE „ZLATNI DELIŠES” | 2 |
| 2.2. KEMIJSKI SASTAV JABUKE | 2 |
| 2.3. AROMA | 3 |
| 2.4. KARAKTERISTIČNI AROMATSKI SPOJEVI | 4 |
| 2.5. BIOSINTEZA AROMATSKIH SPOJEVA | 5 |
| 2.6. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PROIZVODNJU AROMATSKIH SPOJEVA | 7 |
| 2.7. SKLADIŠTENJE JABUKA U HLADNJAČAMA S KONTROLIRANOM ATMOSFEROM I ULO TEHNOLOGIJOM | 10 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 12 |
| 3.1. MATERIJALI | 12 |
| 3.2. METODE RADA | 12 |
| 3.2.1. PRIPREMA UZORAKA | 13 |
| 3.2.2. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA HS-SPME/GC-MS METODOM | 13 |
| 3.2.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM | 14 |
| 4. REZULTATI | 16 |
| 5. RASPRAVA | 22 |
| 6. ZAKLJUČAK | 26 |
| 7. LITERATURA | 27 |

1. UVOD

Jabuka je plod voćke latinskog naziva *Malus Silvestris*. Kombinacijom različitih aroma i okusa pruža svojevrsni užitak uz istovremenu korist po zdravlje organizma.

Jabuka je osvježavajuće voće samo po sebi svojstvene arome i okusa, kojeg najbolje definira njezin slatko kiseli okus. Zbog značajne količine vitamina, minerala, dijetalnih vlakana, povoljno djeluju na ljudsko zdravlje, te smanjuju rizik od mnogih bolesti kao što su dijabetes, astma, karcinom itd. Svrstava se u skupinu jezgričavog voća. Sjemenke su gorkog okusa iz tog razloga nejestive. Plod jabuke je čvrstog i okruglog oblika, a pokožica dolazi u različitim nijansama i bojama, što prvenstveno ovisi o sorti jabuka. Boja može biti crvena, zelena, žuta ili kombinacija ovih boja. Sorte se osim boje, razlikuju i po okusu, slatkoći ili kiselosti i konzistenciji.

Aroma je jedna od najvažnijih karakteristika jabuka, te obično ima odlučujuću ulogu kod potrošača u određivanju kvalitete i poželjnosti ploda stoga je potrebno tijekom rasta ploda poduzeti odgovarajuće mjere kako bi došlo do razvoja karakteristične arome. Sukladno navedenom, identifikacija pojedinih aromatskih spojeva je vrlo važna, kako bi se odredili spojevi karakteristični za okus pojedine sorte jabuke. Identifikacija spojeva se najčešće provodi upotrebom plinske kromatografije i masene spektrometrije. Kako bi se što kvalitetnije očuvao kemijski sastav i fizikalni izgled ploda, dugoročno skladištenje voća i povrća u hladnjačama s kontroliranom atmosferom, točnije ULO (*ultra low oxygen*) hladnjače pokazale su se najučinkovitijima.

Kontrolirana atmosfera je potpuno prirodni proces koji reducira respiraciju na minimum, kontrolirajući prvenstveno koncentraciju ugljikovog dioksida i kisika. Hladnjače s kontroliranom atmosferom omogućuju dostupnost svježeg voća tijekom cijele godine. Kako bi se učinkovito održala kakvoća jabuke, atmosfera spremišta mora imati kontroliranu temperaturu, količinu vlage, kisika i ugljikovog dioksida.

2. TEROIJSKI DIO

2.1. POVIJEST SORTE „ZLATNI DELIŠES“

Sorta Zlatni Delišeš dobivena je kao slučajni sjemenjak oko 1890. godine, a otkrio ju je Anderson H. Mullins u američkoj saveznoj državi West Virginija. Rasadničar Paul Stark otkupio je 1914. godine pravo na proizvodnju te ju je preimenovao u Golden Delicious (Zlatni Delišeš). Danas je ova sorta jabuke najraširenija sorta na cijelom svijetu. (<http://www.horvat.hr/sortiment.php>)

Plodovi ove sorte su srednje krupni do krupni, konusnog oblika, ujednačeni i simetrični po obliku i veličini. Boja ploda je zeleno-žuta, koja u punoj zrelosti dobiva zlatno-žutu nijansu i karakterističnu aromu. Berba Zlatnog Delišeša odvija se u drugoj polovici rujna, kada je pokožica ploda svijetlo zelene boje (<http://agroinfotel.net/jabuka-sorta-ajdared-i-zlatni-delises/>). U ovisnosti o vremenu berbe i tehnologije skladištenja, sezona potrošnje se može produžiti i do dvanaest mjeseci.



Slika 1. Jabuka sorte "Zlatni Delišeš" (Autor: Ivana Horvat, 23.3.2017. godine)

2.2. KEMIJSKI SASTAV JABUKE

Hranjiva vrijednost jabuke je poznata i ona predstavlja varijablu kemijskog sastava jabuke. Kemijski sastav jabuke varira ovisno o kultivaru, a čine ga šećeri, proteini, voda, vitamin C i mineralne tvari: dušik (N), fosfor (P), kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), željezo (Fe). Udio šećera u jabuci varira između 9.53 i 12.34 %, vitamin C varira između 25.75 i 77 mg/100 g svježje jabuke, a vrijednost ukupne kiselosti se kreće između 0.13 i 0.35 %. Udio ukupnog

dušika se kreće između 0.67 i 0.11%, fosfora između 0.15 i 0.24 %, natrija između 0.40 i 0.75 %.

Vrijednosti za Ca variraju između 2.5 i 7.8 mg/100g svježe jabuke, a vrijednosti za željezo variraju između 0.2 i 0.28 mg/100g svježe jabuke. Brojni faktori poput kultivara, regije uzgoja, klime, poljoprivredne prakse, berbe, uvjeta skladištenja i drugih faktora utječu na kemijski sastav jabuke. (Campeanu, i sur., 2009).

Tablica 1. Kemijski sastav svježe jabuke

| SASTOJAK | MJERNA JEDINICA | UDIO U 100g |
|--------------------------|-----------------|-------------|
| VODA | g | 85,56 |
| ENEGRIJA | kcal | 52 |
| PROTEINI | g | 0,26 |
| UKUPNI LIPIDI | g | 0,17 |
| PEPEO | g | 0,19 |
| UKUPNI UGLJIKOHIDRATI | g | 13,81 |
| VITAMIN C | mg | 4,6 |
| KALCIJ (Ca) | mg | 6 |
| MAGNEZIJ (Mg) | mg | 5 |
| CINK (Zn) | mg | 0,04 |
| FRUKTOZA | g | 2,43 |
| SAHAROZA | g | 2,07 |

Izvor: (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2122?manu=&fgcd=&ds=>)

2.3. AROMA

Okus je jedan od najvažnijih i najosobnijih obilježja jabuka i određuju ga okus i aroma. Dok je okus uglavnom određen šećerima i organskim kiselinama, voćnu aromu voća daje kompleksna smjesa velikog broja spojeva koji doprinose ukupnoj senzorskoj kakvoći ploda specifične vrste i sorte. Biosinteza spojeva arome uključuje metaboličke putove u kojima glavni prekursori su masne i aminokiseline, a glavni produkti su aldehidi, alkoholi i esteri.

Aldehidi dominiraju u nezrelim jabukama, no zrenjem ploda njihova koncentracija se smanjuje. Pad koncentracije aldehida, prati povećanje koncentracije alkohola i estera.

Hlapljivi spojevi klasificiraju se kao primarni ili sekundarni spojevi. (Espino-Díaz i sur., 2016). Primarni spojevi su prisutni u netaknutom tkivu voća, dok sekundarni nastaju kao posljedica oštećenja tkiva. Hlapljivi profili voća su kompleksni i ovisni su o sorti, zrelosti, okolišnim uvjetima prije i poslije branja, uzorku voća i metodama analize. (Mohamed El Hadi i sur., 2013)

U voću, spojevi arome se nalaze u vakuolama smještenim na određenim mjestima unutar ploda. Tako se kod jabuka i krušaka aromatični sastojci nalaze u pokožici. Nosači aromatskih sastojaka su razni lipidi, voskovi i pektinske tvari, a metabolizmom stvoren etanol i voda su dobra otapala za aromatične sastojke. Spojevi arome se najčešće oslobađaju tijekom narušavanja stanice.

2.4. KARAKTERISTIČNI AROMATSKI SPOJEVI

Aromatski profil jabuke čini preko 350 hlapljivih spojeva, no samo se nekoliko spojeva ističe u tipičnoj aromi jabuke. Najznačajniji su spojevi koji uključuju estere, alkohole, aldehide, ketone i seskviterpene no kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi u jabuci su esteri koji čine više od 80 % aromatskog profila jabuke. (Mohamed El Hadi i sur., 2013)

Najveća količina hlapljivih spojevi, zbog obilja masnih kiselina proizlaze iz kore jabuke, koje su rezultat izmijenjenih metaboličkih procesa i pojačane enzimske aktivnosti. Više od dvadeset kemijskih supstanci ima izravan utjecaj na karakter same jabuke. Neki od njih su prisutni u vrlo niskim koncentracijama, ali doprinose snažnim karakteristikama arome tipične okusu jabuke, poput etil-2-metil butanoata. Ostali spojevi doprinose intenzitetu aroma, poput trans-2-heksanala, ili su povezani s kvalitetom arome, poput etanola. Iako postoji veliki raspon hlapljivih spojeva u jabuci, većinu tih komponenata čine esteri (78% - 92%) i alkoholi (6% - 16%). (Fellman i sur., 2000).

Empirijskim istraživanjima utvrđeno je za samo nekoliko spojeva koji proizlaze iz plodova jabuke da imaju odlučujući utjecaj na senzorsku kvalitetu jabuke, te su stoga prozvani „utjecajni spojevi“. Među uobičajene „utjecajne spojeve“ kod sorte „Zlatni Delišeš“, spadaju butilacetat, heksil acetat, 2-metilbutil acetat te etil-2-metilbutanoat. Aldehidi su uglavnom dobiveni iz katabolizma masnih kiselina. Oni se također mogu dobiti iz razgranatog lanca aminokiseline, kao što je izoleucin, leucin i valin. Aromatski profil jabuke čini više od 25 aldehida, uglavnom heksanal, trans-2.heksenal i butanal.

Alkoholi su drugi najvažniji spojevi nakon estera koji doprinose aromi zrelih jabuka. Oni nastaju redukcijom odgovarajućih aldehida, djelovanjem enzima alkohol dehidrogenaze (ADH). Linearni alkoholi nastaju katabolizmom masnih kiselina, dok oni razgranatih lanaca, metabolizmom razgranatih aminokiselina. Aromatske komponente koje prevladavaju u jabuci, iz skupine alkohola su 2-metil-1-butanol, 1-butanol, 1-heksanol, 1-propanol i 2-metil-1-propanol. Ovi spojevi su izravni prekursori estera, koje se povremeno mogu fragmentirati na njihove odgovarajuće alkohole i masne kiseline djelovanjem estaraza.

Esteri su primarni spojevi koji imaju najveći utjecaj na aromu ploda, i značajno utječu pridonose kvaliteti zrelih plodova. Uglavnom se sastoje od ravnih ili razgranatih lanaca. U zrelim plodovima jabuke glavni esteri za koje se smatra da u najvećoj mjeri daju tipične karakteristike arome, su heksilacetat, butil acetat, i 2-metilbutil acetat. Esteri se sintetiziraju kondenzacijom alkohola i Co-A derivata karboksilne kiseline alkoholnom aciltransferazom. (Espino-Díaz i sur., 2016)

Hlapljivi spojevi imaju različit doprinos organoleptičkim karakteristikama jabuka. Različite okuse i mirise sorte „Zlatni Delišeš“ uzrokuje prisutnost različitih spojeva. Spoj butanola i heksanola daje okus slatkoće, acetaldehid i trans-2-heksanal bockavu kiselost, etil butirat i etil 2-metilbutirat, voćni okus, a spoj heksil acetata sorti „Zlatni Delišeš“ daje poseban slatko-voćni miris. Ostali spojevi poput propila, butila, pentil acetata ili butil butirata ne pridonose nijednom specifičnom karakteru, ali njihovo odsustvo negativno utječe na aromu. Hlapljive komponente koje mogu uzrokovati neugodnu aromu u jabukama su: acetaldehid (pikantnost), trans-2-heksanal i butil propionat (gorak okus), 3-metilbutil butirat i butil 3-metilbutirat (pokvareni okus), (Yahia, 1994)

2.5. BIOSINTEZA AROMATSKIH SPOJEVA

Početak formiranja arome voća i povrća počinje kada nekoliko čimbenika u okolišu, poput klime, tla, mikronutrijenata i makronutrijenata utječu na njihovu fotosintezu i pravilan razvoj karakteristične arome. Aromatski spojevi su sintetizirani iz metabolizma amino kiselina, masnih kiselina i ugljikohidrata, putem specifičnih biosintetskih putova. Ravnolančani aldehidi, alkoholi i esteri sintetizirani su iz lipida, uglavnom linolnih i linoleinskih kiselina, putem β - oksidacije i aktivnošću liposkigenaze. Aldehidi razgranatih lanaca, alkoholi i esteri su izvedeni iz izoleucina, terpenoidi se sintetiziraju preko puta mevalonata ili deoksiksilulaza fosfatnim putem, a fenilpropanoidi sintetizirani su putem fenilpropanoida.

Masne kiseline

Glavni prekursori hlapljivih spojeva arome u većini voća su masne kiseline. U jabukama, β -oksidacija i put lipoksigenaza su dva glavna enzimska sustava u katabolizmu masnih kiselina, za stvaranje aldehida, alkohola i estera. β -oksidacija je hidroksilinsko cijepanje, koje dovodi do laktona, dok lipoksigenaza tvori aldehide, ketone, kiseline, alkohole, laktone i estere iz lipida. U neoštećenom voću hlapljivi spojevi arome tvore se biosintetskim putem β -oksidacije, a u oštećenom tkivu voća hlapljivi spojevi tvore se putem lipoksigenaze. Tijekom zrenja ploda jabuke, dolazi do povećanja sinteze lipida i promjene membranske fluidnosti, čime se povećava propusnost membrane na različite supstrate. Karakterističan okus i aroma jabuke razvijaju se tijekom zrenja ploda, te nakon berbe.

β -oksidacija masnih kiselina je primarni biosintetski put koji osigurava alkohole i acil koenzim A (CoA) za sintezu estera. Masne kiseline acil-CoA derivata se prevode u kraće lance acil-CoA gubeći po dva ugljika u svakom krugu β -oksidacije, uz prisustvo flavin adenin dinukleotida (FAD), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) i slobodni CoA. Acil CoA reduktaza reducira acil CoA u aldehide, koji se zatim reduciraju u alkohol pomoću alkohol dehidrogenaze (ADH). Alkohol acil CoA transferaza (AAT) koristi alkohol za proizvodnju estera.

Nakon homogenizacije voća, dolazi do oksidacije linolenske i linolne kiseline u različite C6 i C9 aldehide. Ovi hlapljivi spojevi svoj maksimum dosežu već 10-30 minuta nakon homogenizacije. Takvi C6 aldehidi odgovorni su za „zelene“ mirisne note.

Aminokiseline

Metabolizmom aminokiselina valina, leucina, izoleucina, alanina i asparaginske kiseline mogu se proizvesti alkoholi sa razgranatim lancem, esteri i karbonili. Ove aminokiseline su razgranati spojevi alifatske prirode, a sintetizirani su u kloroplastima. Različite koncentracije slobodnih aminokiselina uzrokuju različite koncentracije razgranatih lanaca hlapljivih spojeva u voću. Za izoleucin se smatra da je biosintetski prekursor 2-metil butanske kiseline i njezinih estera u jabukama. U 'Red Delicious', 'Fuji', 'Granny Smith' jabukama su različiti omjeri pretvorbe aminokiselina u hlapljive spojeve, posebice u metabolizmu leucina i izoleucina. To sugerira da različita enzimsko aktivnost i selektivnost, više nego dostupnost supstrata za put degradacije aminokiselina, određuju koncentraciju razgranatih lanaca estera za svaku sortu.

Aldehidi

Pretvorba aldehida do alkohola uključuje ADH (alkohol dehidrogenaza) koja katalizira oksidaciju alkohola i redukciju aldehida sa NAD (alifitična alkohol dehidrogenaza) i NADH (aldehidna dehidrogenaza) kao kofaktore. Alkohol dehidrogenaza iz 'Cox's Orange Pippin' jabuka ima optimalnu aktivnost pri pH 5.5-6.0 kod redukcije acetaldehida i pH 7.0-10.0 kada oksidira etanol. Ima trinaest puta veći afinitet za acetaldehid nego za etanol u jabukama. Iako je ADH u jabukama aktivniji na širokom rasponu aldehida, afinitet supstrata za spojeve duže od C2 ugljikove lance aldehida i alkohola je veći nego za ravne lance, nego za razgranate lance spojeva.

Esteri

Proizvodnja estera u voćnom tkivu je rezultat esterifikacije alkohola, karboksilne kiseline i acil-CoA u oksidativnim reakcijama. Optimalna temperatura za maksimalnu aktivnost je 30 °C, pH raspon je 7-7.8, sulfidril grupe su neophodne za aktivnost. Aktivnost je povezana sa metabolizmom lipida. Jabuke izložene atmosferi koja sadrži alkohole niske molekulske mase, imaju povećanu koncentraciju estera s odgovarajućim alkoholnim dijelom.

2.6. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PROIZVODNJU AROMATSKIH SPOJEVA

Zbog složene prirode hlapljivih spojeva, aromatski profil svježeg voća se kontinuirano mijenja. Mnogi su čimbenici koji utječu na sastav aromatskih spojeva, uključujući genetsku strukturu plodova, zrelost, okolišne uvjete tijekom proizvodnje, rukovanje nakon berbe i skladištenje.

Utječući faktori prije berbe

Sunčeva svjetlost, dostupnost vode, kemijske promjene tla, gnojidba, su samo neki od čimbenika koji imaju odlučujući utjecaj na rast usjeva i kvalitetu krajnjeg produkta.

Genetska struktura plodova

Aromatski profil jabuke uvelike ovisi o sorti. Ono što svaku sortu čini prepoznatljivom, jest razlika u koncentraciji aromatskih spojeva. 2-metil acetat glavni je ester u jabukama poput „Bisbee“, „Red Delicious“ te „Fuji“, dok je butil acetat glavni ester u sortama poput „Zlatnog Deliše“, „Royal Gala“ i „Mondial Gala“.

Okolišni čimbenici

Okolišni čimbenici također mogu utjecati na sastav hlapivih spojeva u jabukama. Isto tako dokazano je da na profil aromatskih spojeva može utjecati i vremensko razdoblje, geografski položaj kao i kulturna praksa. Zerbini i suradnici (1980), ustvrdili su da toplije vrijeme više pogoduje razvoju dominantnih spojeva arome, što posljedično veže i bolju kvalitetu samog ploda jabuke. Istraživanjem su ustvrdili da skladištenjem sorte „Zlatni Delišes“ koja je brana na ravninama Italije, ima veću specifičnu težinu, niži udio ukupnih šećera, viši udio topivih krutih tvari, više reducirajućih šećera, od onih plodova jabuke čija berba se odvijala na planinskim predjelima Italije.

Zrelost

Zrelost je jedan od kritičnih čimbenika koji utječu na udio hlapljivih spojeva u voću. Idealna berba jabuka, trebala bi se provoditi pri najvećoj koncentraciji aroma, kako bi došlo do stvaranja hlapivih spojeva koji izravno utječu na sam okus ploda. Međutim, zbog skladištenja a potom i povećanja tržišnog vijeka, često se berba plodova se vrši u nezrelom stadiju. Iako nezreli plodovi su uspješniji za skladištenje i transport, često dolazi do nedostatka okusa zbog bliske veze između zrelosti i biosinteze hlapivih spojeva.

Utječući faktori nakon berbe

Različite tehnike i tretmani se koriste u svrhu produljenja roka trajnosti plodova voća. Često ti tretmani uključuju, skladištenje voća u hladnim uvjetima, toplim uvjetima, zračenje, različite atmosfere skladištenja kao i tretiranje plodova raznim kemijskim spojevima. Svi ovi čimbenici utječu na aromatski profil plodova.

Utjecaj kemijskih spojeva

Tretiranje plodova kalcijem (Ca), je jedan od tretmana koji je odavno ušao u praksu. Primjenjivanje ove prakse usmjereno je kako bi se izbjegao razvoja gorkih koštica unutar plodova jabuke. Koncentracija kalcija nakon skladištenja pod zrakom u komercijalno zrelim „Red Reinders“ jabukama, značajno poboljšava proizvodnju hlapivih spojeva arome, dok na proizvodnju hlapivih spojeva arome u manjoj mjeri utječu uvjeti kontrolirane atmosfere.

Metil jasmonat kemijski spoj koji sam ili zajedno sa etanolom, može modificirati biosintezu hlapivih spojeva. Primjenom metil jasmonata mogu se izbjeći neželjene promjene u

aromatskom profilu plodova, koje se pojavljuju tijekom i nakon skladištenja, kao i minimiziranje gubitka hlapivih komponenata u istom.

Temperatura skladištenja

Temperatura skladištenja temeljni je čimbenik koji utječe na okus voća. Koncentracija hlapivih spojeva arome se povećava povećavanjem temperature do 32⁰C nakon čega se stopa proizvodnje aromatskih spojeva smanjuje.

Tijekom dvanaesto tjednog skladištenja jabuke sorte „Jonagold“ na temperaturama od -1⁰C do 10⁰C, došlo je do usporednog povećanja koncentracije estera i alkohola sa povećanjem temperature skladištenja. Jabuke sorte „Red Delicious“ imale su maksimalnu koncentraciju estera pri temperaturi od 22⁰C, povećanjem temperature na 32⁰C došlo je smanjenja udjela hlapivih spojeva, dok na 46⁰C se inhibira, što ukazuje da toplinskom obradom privremeno se mogu zaustaviti ili inaktivirati enzimi koji su odgovorni za proizvodnju hlapivih spojeva arome. Jabuke koje su nakon skladištenja na niskim temperaturama, prebačene na 20⁰C, proizvode veće koncentracije hlapljivih spojeva od svježe ubranih jabuka, što je specifično za sortu.

Skladišna atmosfera

U stadiju fiziološke zrelosti ubire se vrlo mali postotak voća koji je u takvom obliku dostupan na tržištu, većina voća i povrća ubrana je u stadiju tehnološke zrelosti radi skladištenja. Kako bi se produljio rok trajanja voća, ono se podvrgava skladištenju pod različitim uvjetima čija je svrha dostupnost istoga tokom cijele godine.

Skladištenje jabuka u uvjetima niske temperature, niskog udjela kisika (O₂) i visokog udjela ugljičnog dioksida(CO₂), je tehnika skladištenja koja se najviše koristi. Kontrolirani uvjeti skladištenja, jabuka mogu dovesti do smanjenja kapaciteta ka proizvodnji etilena, što posljedično veže i promjenu samog aromatskog profila jabuke.

Korištenje ambalaže i jestivih premaza može stvoriti modificiranu atmosferu (MA) sa smanjenom razinom O₂ i povišenom razinom CO₂, slično kao i kod kontrolirane atmosfere (CA). Korištenje jestivih premaza kod jabuka i citrusa, utječe na okus i razinu hlapljivih spojeva. Naime, barijera koju stvaraju jestivi premazi potiče aerobno disanje i sintezu etanola i acetaldehida.

2.7. SKLADIŠTENJE JABUKA U HLADNJAČAMA S KONTROLIRANOM ATMOSFEROM I ULO TEHNOLOGIJOM

Režimi čuvanja voća i povrća prvenstveno zavise od vrste voća i povrća koje se skladišti, a zatim i od pojedinih sorti. Poznato je da s porastom temperature svi procesi unutar ploda biljke se odvijaju brže, a ukoliko snizimo temperaturu skladištenja dolazi do usporavanja svih procesa unutar ploda. Hladnjače s kontroliranom atmosferom osim niskih temperatura koriste i promijenjenu atmosferu unutar komora sa sniženim udjelom O_2 i povećanim udjelom CO_2 .

U kontroliranoj atmosferi vrlo je važno vrijeme potrebno da se uspostavi tzv. ULO režim. Za većinu sorti potrebno je da to vrijeme bude što kraće, najviše tri dana. Kako bi se kisik spustio sa standardnih 21% koliko ga ima u normalnom zraku potrebno je ubaciti čisti dušik, također u navedenom procesu iznimno je važno kontrolirati količine CO_2 , naime u takvom režimu ukoliko je koncentracija CO_2 prevelika, istraživanjima je utvrđeno da dolazi do značajnog oštećenja skladištenog ploda. (Lumpkin i sur., 2015).

Samo se plodovi bez oštećenja mogu skladištiti u komorama s ULO režimom, također u komorama pod ULO režimom relativna vlažnost zraka mora biti visoka, najčešće od 90 do 95%. Ako bi vlažnost zraka bila niža, došlo bi do jače transpiracije i plodovi bi postali smežurani i bez tržišne vrijednosti. (Radenkova i sur., 2016)

Jabuka spada u grupu voćnih vrsta čiji se plodovi u svježem stanju mogu čuvati duže nego plodovi većine drugih vrsta. Kod pojedinih sorti, plodovi se mogu čuvati i do dvanaest mjeseci. Na dužinu čuvanja utječe veliki broj faktora kao što su: sorta, kvaliteta ploda, mjesto proizvodnje, priprema za skladištenje, pakiranje, način skladištenja i drugo. Pri tome se podrazumijeva da je berba obavljena u optimalnom roku. (Brackmann i sur., 1993)

U plodu jabuke se nakon berbe i dalje odvija disanje (respiracija) i različiti procesi dozrijevanja. Respiracija je proces tijekom kojeg se organski sastojci poput masti, ugljikohidrata i proteina, razgrađuju na jednostavnije produkte uz oslobodjenje topline. Tijekom procesa respiracije troši se kisik i oslobađa se ugljikov dioksid, što dovodi do gubitka uskladištenih rezervi u plodu, što u konačnici rezultira ubrzanjem starenja i smanjenjem tržišne vrijednosti proizvoda (jabuke). Što je disanje brže to je i vrijeme skladištenja kraće, i obrnuto.

Kako bi se smanjila brzina disanja i produžili vrijeme čuvanja jabuka, pored niskih temperatura primjenjuje se i ULO tehnologija. Takav tip čuvanja jabuka, podrazumijeva da se plodovima ne dopusti da normalno dišu, tj. smanjiti udio kisika, što rezultira usporenom respiracijom. (Harb i sur., 2000)

Pod procesima dozrijevanja podrazumijeva se nekoliko odvojenih procesa, kao što su omekšavanje teksture mesa, promjena boje kože, snižavanje ukupne kiselosti i dr. Kako bi plod tijekom čuvanja što duže zadržao kvalitetu koju je imao prilikom berbe, potrebno je usporiti disanje i dozrijevanje. Dozrijevanje i respiraciju ploda nemoguće je zaustaviti, ali se može značajno usporiti skladištenjem u određenim uvjetima tj. stvaranjem (umjetne) kontrolirane mikroatmosfera. Jabuke sintetiziraju etilen koji ima vrlo važnu ulogu u starenju i dozrijevanju. Kako su jabuke jako osjetljive na egzogeni etilen, potrebno ga je odvajati iz zraka u komorama s kontroliranom atmosferom.

Prilikom određivanja temperature čuvanja treba uzeti u obzir sortu, dužinu čuvanja i željeno stanje plodova na kraju skladištenja. Plodovi većine sorti jabuka mogu podnijeti temperature od -1,4 do -2,8°C, ali se čuvanje na temperaturama ispod 0°C rijetko prakticiraju kod jabuka. Za svaku sortu postoji kritična temperatura ispod koje, u slučaju dužeg čuvanja, dolazi do pojave različitih fizioloških oboljenja (<http://www.tehnologijahrane.com>).

Optimalna temperatura čuvanja većine sorti jabuka kreće se od 0 do 3°C. Većina kultiviranih sorti jabuka skladišti se u uvjetima sa sadržajem O₂ od 1% do 2,5% i CO₂ od 0,3% do 2,5%. Za naknadno dozrijevanje jabuka, poslije čuvanja se koriste komore koje su nepropustljive za plinove.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korištena je jabuka sorte „Zlatni Delišeš“ koja je do 22. ožujka 2017. godine bila skladištena u ULO hladnjačama voćarske tvrtke Mirošan d.o.o., Petrovče, Slovenija (<https://www.mirosan.si>), na temperaturi od 1°C te sa sljedećima razinama O₂ 1% i 1% CO₂. Od 22. ožujka 2017. godine do 24. travnja 2017. godine 120 kilograma (kg) jabuka preneseno je u Laboratoriju za prehranu na Katedri za tehnologije, prehranu i vino, Odelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta Sveučilišta u Ljubljani, te raspoređeno u četiri ULO hladnjače u kojima je bila uspostavljena kontrolirana atmosfera te je u svakoj hladnjači pohranjeno 30 kg jabuka.

APARATURA I PRIBOR

- Analitička vaga – Mettler Toledo, Švicarska
- Filtar papir
- Lijevak za filtriranje
- Kivete – volumena 50 ml
- Porculanski tarionik
- HS – SPME / GC – MS
- Staklene čaše – volumena 50 ml
- Bočice za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom - volumena 10 ml
- Centrifuga - Avanti JXN- 26 centrifuge
- Mikropipeta – 1- 10 ml.

REAGENSI

- 10% CaCl₂

3.2. METODE RADA

Praćeno je dozrijevanje ploda na tri temperature skladištenja 4°C, 8°C i 12°C, dok je temperatura od 20°C bila namijenjena za simulaciju uvjeta skladištenja na trgovinskim policama, relativna vlaga (RH) u hladnjačama je održavana između 75% do 80%, osim u uvjetima skladištenja na 20°C gdje se relativna vlaga održavala između 50% do 60%. Svaki drugi dan uzimao se uzorak od 10 plodova, sa svake temperature, te se uzetim uzorcima mjerila čvrstoća i postotak suhe tvari putem analizatora za teksturu voća i digitalnog refraktometra, također sa uzetih plodova uzimali su se uzorci za mjerenje arome i šećere

3.2.1. PRIPREMA UZORKA

Sa svake temperature uzorkovano je 10 plodova jabuke. Pokožica i mesnati dio jabuke usitnjeni su do praha u porculanskom tarioniku pomoću tekućeg dušika te pohranjeni u kivetama volumena 50 ml. U epruvetama je bilo 10 g usitnjenog uzorka jabuke i 10 g 10% kalcijevog klorida (CaCl_2).

Uzorci su bili skladišteni u hladnjači na - 20°C. Uzorci su prije analize centrifugirani (Avanti JXN- 26 centrifuge), nakon centrifuge uzorci jabuke se filtriraju preko filter papira u staklene čaše volumena 50 ml. Nakon čega se mikropipetom, otpipetira 3 ml uzorka i prenosi u bočice za uzorkovanje *headspace* tehnikom s aluminijskim čepom - volumena 10 ml, dok se ostatak prenosi u epruvete volumena 5 ml. Uzorkovanje se provodilo svaki drugi dan, a na uzorcima jabuke određivan je sastav aromatskih spojeva.



Slika 2. Priprema uzorka za arome, usitnjavanjem kriška jabuke sa tekućim dušikom. (Autor: Ivana Horvat, 11.4.2017. godine)

3.2.2. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA HS-SPME/GC- MS METODOM

HS-SPME (*Headspace solid-phase microextraction*), tj. mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi je jednostavna i brza metoda za izolaciju hlapljivih i nehlapljivih spojeva, koja ne koristi otapalo. Metoda kombinira ekstrakciju, koncentriranje i direktan prijenos apsorbiranih spojeva do injektora plinskog kromatografa (Bart, 2006). Uzorak s hlapljivim spojevima stavi se u staklenu bočicu, te se zatvori odgovarajućim čepom sa septumom. SPME igla se uvodi kroz septum, a vlakno prolazi kroz iglu.

Vlakno je izloženo fazi pare koja se nalazi iznad tekućeg uzorka. Preko vlakna se vrši ekstrakcija. Nakon određenog vremena ekstrakcije, vlakno se povuče u iglu, te se igla ukloni iz bočice i direktno uključi u injektor plinskog kromatografa. Desorpcija spojeva iz ovojnice vlakna se provodi zagrijavanjem vlakna u injektoru plinskog kromatografa. HS-SPME tehnika u kombinaciji sa plinskom kromatografijom uz masenu detekciju (GC-MS) ili plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) su prikladni za ekstrakciju hlapljivih spojeva u tekućim uzorcima.

Plinski kromatograf (GC) se koristi za separaciju komponenti, a maseni spektrometar (MS) za detekciju i identifikaciju spojeva. Maseni spektrometar injektirani materijal ionizira u visokom vakuumu, pokreće i usmjerava ione prema detektoru, koji skuplja i mjeri količine svakog prikupljenog iona (McMaster, 2008).



Slika 3. Priprema uzoraka arome za headspace bočice, filtriranjem preko filter papira. (Autor: Ivana Horvat 24.4.2017. godine)

3.2.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Ekstrakcija hlapljivih spojeva se izvodi pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (SPME, Stable Flex, Supelco), vlakna su obložena sa Carboxen/polidimetilsiloksan sorbensom (1 cm, 85 µm debljine, Supelco, Bellefonte, PA). Analiza je provedena na GC 7890A plinskom kromatografu (Agilent Technologies, CA, SAD) opremljenim s MPS2 višenamjenskim autosamplerom (Gerstel GmbH, Mülheim an der Ruhr, Njemačka) i 5975C masenim spektrometrom (Agilent Technologies). Uzorci bočice su postavljeni u toplinskom modulu kontrolirane temperature pri 40°C na 30 minuta. Hlapljivi spojevi se desorbiraju u GC injektor na 250°C na ne rascijepan način na dvije minute.

Plinski kromatograf je opremljen sa ZB-WAX kapilarnom kolonom, 60 m x 0.32 mm ID sa 1 µm debljinom filma. Helij je plin nosač pri brzini protoka od 1.2 mL/min na 40°C. Temperatura peći bila je programirana na sljedeći način: početna temperatura od 40°C zadržana je na 5 min, a zatim 4°C/min do 230°C. Hlapljivi spojevi su identificirani sa selektivnim masenim detektorom (5975C, Agilent Technologies, CA, USA). Detektor je djelovao u m/z rasponu između 30 i 250, izvor iona i kvadrupolna temperatura su održavani pojedinačno na 250 i 150°C.

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom masenih spektara s onim dostupnim komercijalnim standardima, sve spojeve je potvrdilo podudaranje masenih spektara s NIST 2.0 masenih spektralnih podataka (National Institute of Standards and Technology, USA).

4. REZULTATI

U radu je provedena analiza aromatskog sastava jabuke sorte „Zlatni Delišeš“ koja je bila skladištena u hladnjačama s kontroliranom atmosferom i jako niskom koncentracijom kisika (ULO), na četiri različite temperature 4°C, 8°C, 12°C i 20°C. Istraživalo se kako različite temperature skladištenja u kontroliranim uvjetima utječu na aromatski profil plodova jabuke.

Ukupno je identificirano osam hlapljivih spojeva od kojih je tri alkohola i pet estera. Identificirani su esteri butil acetat, etil butanoat, 3-metilbutil acetat, 2-metilbutil acetat, heksil acetat, te alkoholi 1-butanol, 1-heksanol i 2-metil-1-butanol.

Koncentracije identificiranih aromatskih spojeva, tijekom skladištenja prikazani su kroz tablice (2-11).

Tablica 2. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 2 dana skladištenja

| Temperatura °C | 1-butanol [µg/L] | 1-heksanol [µg/L] | 2-metil-1-butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3-metilbutil acetat [µg/L] | 2-metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 4 | 724,8±22 4,0 | 275,5±80 ,5 | 406,6±10 8,4 | 70,4±22, 7 | 21,3±25, 3 | 16,6±1,6 | 49,7±5,8 | 45,8±7,6 |
| 8 | 830,2±6, 2 | 211,3±4, 0 | 302,8±35 ,9 | 71,7±3,2 | 4,3±0,6 | 14,9±2,7 | 52,7±6,0 | 52,7±2,4 |
| 12 | 617,9±97 ,7 | 244,5±26 ,6 | 519,8±49 ,3 | 45,1±10, 1 | 11,5±11, 0 | 15,4±3,3 | 50,3±7,4 | 43,6±6,3 |
| 20 | 255,9±57 ,8 | 101,6±30 ,4 | 394,5±30 ,7 | 14,0±4,7 | 4,5±1,8 | 10,7±0,8 | 32,9±3,7 | 24,1±6,0 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 3. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 5 dana skladištenja

| Temperatura °C | 1- butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil- 1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbutil acetat [µg/L] | 2- metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| 4 | 412,5±15 9,4 | 146,5±31 ,5 | 369,2±56 ,7 | 48,2±23, 3 | 6,0±0,9 | 20,6±3,3 | 67,3±19,6 | 42,4±11,8 |
| 8 | 474,1±20 1,7 | 137,1±49 ,6 | 391,1±86 ,0 | 69,1±38, 4 | 10,4±10, 0 | 14,3±4,2 | 59,8±9,6 | 41,0±17,3 |
| 12 | 199,3±4, 2 | 79,9±5,8 | 457,9±73 ,3 | 16,5±1,5 | 8,3±2,6 | 13,3±2,1 | 58,7±10,7 | 22,3±1,0 |
| 20 | 353,1±90 ,5 | 116,6±37 ,9 | 409,4±98 ,4 | 27,5±9,0 | 6,9±0,9 | 7,4±3,5 | 40,7±4,8 | 34,3±7,3 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 4. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 9 dana skladištenja

| Temperatura °C | 1-butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil- 1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbutil acetat [µg/L] | 2- metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|-------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| 4 | 330,0±153, 8 | 98,0±48, 1 | 272,9±2,8 | 50,2±30,6 | 28,5±18 ,5 | 14,7±3,7 | 51,5±12,7 | 31,9±13,4 |
| 8 | 257,6±126, 5 | 88,5±46, 0 | 328,2±44, 8 | 36,8±25,6 | 7,1±2,4 | 11,5±1,9 | 50,0±13,2 | 25,1±11,2 |
| 12 | 354,7±153, 6 | 120,9±4 5,1 | 375,6±49, 9 | 42,5±26,1 | 11,3±1, 8 | 8,6±1,0 | 54,1±15,6 | 31,2±11,4 |
| 20 | 1114,2±37 2,9 | 379,8±1 23,5 | 885,2±49, 6 | 159,8±80, 1 | 17,6±9, 8 | 5,0±0,6 | 121,8±31,7 | 73,5±30,5 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 5. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 12 dana skladištenja

| Temperatura °C | 1-butanol [µg/L] | 1-heksanol [µg/L] | 2-metil-1-butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3-metilbutil acetat [µg/L] | 2-metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 4 | 259,6±81,7 | 88,8±26,4 | 361,6±65,8 | 57,1±28,2 | 8,4±1,9 | 24,4±6,9 | 97,8±39,0 | 41,7±17,6 |
| 8 | 243,4±75,6 | 125,9±37,8 | 416,4±22,7 | 32,5±19,8 | 12,5±7,0 | 8,2±1,3 | 54,1±5,0 | 28,5±7,9 |
| 12 | 880,3±250,9 | 308,1±85,6 | 727,6±28,9 | 138,3±34,6 | 12,9±2,8 | 5,8±2,0 | 104,8±6,3 | 62,9±13,0 |
| 20 | 2920,8±535,6 | 912,7±165,5 | 2507,8±211,4 | 590,6±71,1 | 15,0±4,2 | 4,3±1,2 | 300,5±12,9 | 150,8±12,8 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 6. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 16 dana skladištenja

| Temperatura °C | 1-butanol [µg/L] | 1-heksanol [µg/L] | 2-metil-1-butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3-metilbutil acetat [µg/L] | 2-metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|-------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 4 | 179,1±39,0 | 89,1±30,9 | 617,1±125,4 | 29,5±11,6 | 3,5±0,2 | 14,6±2,6 | 57,8±3,3 | 23,6±3,2 |
| 8 | 688,3±86,6 | 282,60±43,2 | 561,8±81,3 | 136,7±36,9 | 5,0±0,8 | 6,5±1,0 | 80,8±17,7 | 54,2±12,1 |
| 12 | 1510,2±161,5 | 398,5±33,9 | 988,1±109,2 | 269,7±24,9 | 6,8±1,5 | 4,5±1,3 | 119,8±8,5 | 68,2±9,2 |
| 20 | 3359,0±762,1 | 623,5±126,3 | 2241,0±463,3 | 681,3±294,5 | 19,6±2,4 | 2,2±0,2 | 267,1±56,6 | 98,0±27,8 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 7. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 19 dana skladištenja

| Tempera- tura °C | 1-butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil-1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbut il acetat [µg/L] | 2-metillbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 4 | 439,9±11,0 | 109,7±4,4 | 369,7±36,4 | 58,2±10,3 | 7,0±3,3 | 8,5±2,3 | 39,2±4,4 | 33,3±3,8 |
| 8 | 846,9±205,1 | 213,0±46,3 | 512,5±92,0 | 108,2±15,9 | 7,8±0,9 | 4,1±0,4 | 69,4±14,6 | 41,7±4,7 |
| 12 | 2102,5±888,0 | 424,7±152,0 | 1113,8±354,9 | 318,7±174,3 | 10,7±6,6 | 2,8±0,8 | 193,2±97,7 | 93,0±46,1 |
| 20 | 3241,2±966,8 | 568,3±158,3 | 1991,5±189,4 | 418,2±166,7 | 8,1±0,9 | 1,5±0,1 | 214,1±17,4 | 73,9±21,1 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 8. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 22 dana skladištenja

| Tempera- tura °C | 1-butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil-1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbutil acetat [µg/L] | 2- metillbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 4 | 413,3±128,7 | 147,2±76,0 | 402,0±131,6 | 81,3±10,9 | 4,9±1,7 | 8,1±2,4 | 56,8±12,1 | 43,8±4,2 |
| 8 | 1254,8±588,1 | 357,7±130,2 | 920,2±164,3 | 223,6±126,5 | 6,9±0,8 | 4,4±1,7 | 117,6±4,3 | 71,0±20,7 |
| 12 | 3110,6±358,1 | 659,4±98,0 | 1656,2±83,5 | 674,9±149,3 | 12,7±4,4 | 3,9±0,9 | 265,0±55,9 | 148,8±54,4 |
| 20 | 4537,3±389,0 | 731,5±133,4 | 2180,3±323,5 | 932,8±8,7 | 9,7±3,2 | 1,5±0,1 | 258,0±30,3 | 128,6±13,5 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 9. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 27 dana skladištenja

| Tempera- tura °C | 1- butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil- 1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbut il acetat [µg/L] | 2-metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 4 | 467,6±12 9,0 | 129,0±37,7 | 380,3±20 ,8 | 134,9±87 ,1 | 9,6±5,3 | 8,7±1,9 | 67,4±33,3 | 53,9±24,0 |
| 8 | 2037,2±4 06,9 | 432,2±43,0 | 761,7±37 ,5 | 663,7±37 2,6 | 11,5±7,1 | 4,1±0,5 | 213,0±81,6 | 156,6±69,0 |
| 12 | 5354,2±8 52,2 | 925,7±80,3 | 1897,1±1 61,2 | 1196,5±2 25,6 | 13,3±8,1 | 1,9±0,4 | 261,7±40,7 | 207,7±26,9 |
| 20 | 7216,1±8 47,4 | 988,0±116, 5 | 1951,8±2 67,2 | 1388,3±2 55,4 | 10,2±2,6 | 1,0±0,2 | 215,7±11,8 | 186,5±48,6 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 10. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 30 dana skladištenja

| Tempera- tura °C | 1-butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil-1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbut il acetat [µg/L] | 2-metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|------------------------|---------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| 4 | 488,1±266, 1 | 134,6±42 ,3 | 395,3±54,9 | 80,7±51, 6 | 3,8±0,4 | 4,2±0,9 | 45,0±16,8 | 33,0±14,6 |
| 8 | 2287,0±31 2,3 | 537,4±50 ,6 | 921,9±65,4 | 441,1±10 5,2 | 10,9±5,5 | 2,9±0,2 | 121,0±23,8 | 80,8±17,8 |
| 12 | 6711,6±86 1,5 | 1095,5±7 0,5 | 2033,3±41 2,8 | 1496,1±2 54,9 | 18,4±2,9 | 1,9±0,5 | 254,8±94,4 | 198,3±15,2 |
| 20 | 8570,8±73 3,6 | 1267,2±1 89,4 | 1815,8±22 4,8 | 1835,2±5 17,1 | 17,3±11, 2 | 0,7±0,1 | 203,8±40,5 | 238,9±85,5 |

* navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Tablica 11. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva identificiranih nakon 33 dana skladištenja

| Tempera- tura °C | 1-butanol [µg/L] | 1- heksanol [µg/L] | 2-metil-1- butanol [µg/L] | Butil acetat [µg/L] | Etil butanoat [µg/L] | 3- metilbutil acetat [µg/L] | 2- metilbutil acetat [µg/L] | Heksil acetat [µg/L] |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 4 | 700,7±159, 7 | 173,9±38, 8 | 454,8±105, 2 | 140,9±49, 0 | 5,5±1,1 | 4,1±1,2 | 68,5±21,0 | 52,5±13,4 |
| 8 | 3240,3±20 6,2 | 627,5±11 1,1 | 1064,9±96, 1 | 954,5±14 8,6 | 7,3±1,5 | 4,7±1,4 | 211,0±51,4 | 160,6±5,5 |
| 12 | 7964,6±17 41,9 | 1081,5±1 23,1 | 1704,3±23 1,1 | 2098,2±4 42,2 | 17,4±4,1 | 2,4±0,4 | 392,4±112, 9 | 338,0±82,2 |
| 20 | 1970,5±24, 6 | 400,7±36 5,1 | 759,8±970, 3 | 547,7±39 6,9 | 6,4±14,7 | 4,4±0,6 | 139,8±16,2 | 106,5±17,6 |

** navedeni rezultati u tabeli prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija*

5. RASPRAVA

U radu je provedena analiza aromatskog sastava jabuke sorte „Zlatni Delišeš“ koja je bila skladištena u hladnjačama sa kontroliranom atmosferom i jako niskom koncentracijom kisika (ULO), na četiri različite temperature 4⁰C, 8⁰C, 12⁰C i 20⁰C kroz trideset i tri dana.

Istraživanje je provedeno kako bi se utvrdio utjecaj različitih temperatura skladištenja u kontroliranim uvjetima na aromatski profil plodova jabuke. Rezultati i identificirani aromatski spojevi prikazani su kroz tablice (2-11).

Nakon drugog dana skladištenja jabuke na temperaturi od 8⁰C (Tablica 2), identificiran je 1-butanol u velikoj koncentraciji (830,2±6,2 µg/L), dok najmanja koncentracija istog spoja drugog dana skladištenja identificirana kod jabuka skladištenih na temperaturi od 20⁰C (255,9±57,8 µg/L). Petog dana skladištenja najveća koncentracija 1-butanola bila je također u jabuci koja je bila skladištena na 8⁰C (474,1±201,7 µg/L) (Tablica 3), ali je značajno manja nego drugog dana skladištenja (474,1±201,7 µg/L). Nagli porast koncentracije 1-butanola primjećuje se devetog dana skladištenja i to kod jabuka koje su skladištene na 20⁰C (1114,2±372,9 µg/L) (Tablica 4), dok dvanaestog dana skladištenja na temperaturi od 20⁰C koncentracija 1-butanola se udvostručuje (2920±535,6 µg/L) (Tablica 5), dok kod jabuka skladištenih na 8⁰C dvanaestog dana koncentracija 1-butanola pala je na minimalnih (243±75,6 µg/L) (Tablica 5). Iz rezultata je vidljivo da se u jabukama skladištenim na 20⁰C razvija 1-butanol kroz vrijeme, stoga možemo primijetiti da koncentracija istoga šesnaestog dana skladištenja iznosi 3359,0±762,1 µg/L (tablica 6), što je oko 11 puta više nego drugog dana skladištenja (255±57,8 µg/L) na 20⁰C.

Koncentracija 1-butanola nakon dvadesetsedmog dana skladištenja na temperaturi od 20⁰C je porasla za 4 puta 8570,8±733,6 µg/L (Tablica 10), s obzirom na koncentraciju istoga nakon dvadesetdrugog dana kada je iznosila 4537,3±9,0 µg/L (Tablica 8). Koncentracija 1-butanola nakon dvadeset i dva dana skladištenja jabuka na 8⁰C se udvostručila 1254,8±588,1 µg/L (Tablica 8), s obzirom na koncentraciju istog nakon dvadeset i sedam dana skladištenja 2037,2±406,9 µg/L (Tablica 9). Nakon trideset i tri dana skladištenja jabuka na temperaturi od 20⁰C, primjećuje se znatni pad koncentracije 1-butanola 1970,5±24,6 µg/L (Tablica 11), što je skoro 5 puta manja koncentracija od koncentracije nakon 30 dana skladištenja na temperaturi od 20⁰C (8570,8±733,6 µg/L). Sudeći po rezultatima, vidljivo je da koncentracija 1-butanola nakon trideset i tri dana skladištenja jabuka na temperaturi od 8⁰C iznosi 3240,3±206,2 µg/L što je skoro za dva puta više nego tridesetog dana skladištenja jabuka na istoj temperaturi,

kada je koncentracija 1-butanola iznosila $2287,0 \pm 312,3 \text{ } \mu\text{g/L}$, dok koncentracija 1-butanola nakon trideset dana skladištenja jabuka na temperaturi od 20°C se smanjila skoro za 4 puta ($8570,8 \pm 733,6 \text{ } \mu\text{g/L}$), s obzirom na koncentraciju trideset i trećeg dana kada je iznosila $1970,5 \pm 24,6 \text{ } \mu\text{g/L}$.

Najmanja koncentracija 1-butanola nakon trideset i tri dana skladištenja bila je kod jabuka skladištenih na 4°C , te je iznosila $700,7 \pm 159,7 \text{ } \mu\text{g/L}$ (Tablica 11). Koncentracija 1-butanola kod jabuka skladištenih na temperaturi od 4°C postepeno pada od drugog dana skladištenja ($724,8 \pm 224,0 \text{ } \mu\text{g/L}$) (tablica 2) do šesnaestog dana skladištenja ($179,1 \pm 39,0 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 6). Nakon trideset i tri dana skladištenja jabuka na 4°C , koncentracija 1-butnola se povisila za skoro dva puta ($700,7 \pm 159,7 \text{ } \mu\text{g/L}$), s obzirom na koncentraciju nakon devetnaest dana skladištenja kada je iznosila ($439,9 \pm 11,0 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 7).

Najveća koncentracija 1-butanola nakon trideset i tri dana skladištenja bila je kod jabuka skladištenih na 12°C , te je iznosila $7964,6 \pm 1741,9 \text{ } \mu\text{g/L}$ (Tablica 11), što je za četiri puta viša koncentracija, od koncentracije 1-butanola kod jabuka skladištenih na 20°C ($1970,5 \pm 24,6 \text{ } \mu\text{g/L}$).

Najveća koncentracija heksil acetata, estera koji nosi slatko voćni miris, nakon drugog dana skladištenja je bila kod jabuka koje su skladištene na temperaturi od 8°C ($52,7 \pm 2,4 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 2), dok nakon petog dana skladištenja koncentracija istoga se smanjuje te na temperaturi skladištenja od 8°C petog dana ona iznosi $41,0 \pm 17,3 \text{ } \mu\text{g/L}$ (Tablica 3). Najmanja koncentracija heksil acetata nakon drugog dana skladištenja je bila pri temperaturi skladištenja jabuka od 20°C ($24,1 \pm 6,0 \text{ } \mu\text{g/L}$), što se nakon petog dana skladištenja mijenja, te najmanja koncentracija istog spoja sada je na 12°C i iznosi $22,3 \pm 1,0 \text{ } \mu\text{g/L}$ (Tablica 3). Nakon devetog dana skladištenja koncentracija heksila acetata na temperaturi skladištenja jabuka od 8°C ($25,1 \pm 11,2 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 4) se smanjila za duplo s obzirom na koncentraciju istoga drugog dana skladištenja na temperaturi od 8°C ($52,7 \pm 2,4 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 2). Najveća koncentracija heksil acetata devetog dana skladištenja jabuka je bila na temperaturi od 20°C ($73,5 \pm 30,5 \text{ } \mu\text{g/L}$), dok nakon petog dana skladištenja najveća koncentracija istoga je na temperaturi skladištenja jabuka od 4°C ($42,4 \pm 11,8 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 2).

Najveća koncentracija heksil acetata od devetog dana skladištenja do devetnaestog dana skladištenja jabuka se zadržava na temperaturi od 20°C . Dvanaestog dana skladištenja jabuka na temperaturi od 20°C koncentracija heksil acetata se naglo povećava ($150,8 \pm 12,8 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Tablica 5), s obzirom na koncentraciju istoga pri istoj temperaturi nakon devetog dana

skladištenja kada je koncentracija heksil acetata iznosila ($73,5 \pm 30,5 \mu\text{g/L}$) (Tablica 5). Nakon devetnaestog dana skladištenja jabuka najveća koncentracija heksil acetata je pri temperaturi skladištenja od 12°C , te se kao takva zadržava do zadnjeg dana skladištenja jabuka. Koncentracija heksil acetata trideset i trećeg dana skladištenja iznosi ($338,0 \pm 82,2 \mu\text{g/L}$) (Tablica 11), što je za skoro četiri puta viša koncentracija od one devetnaestog dana skladištenja ($93,0 \pm 46,1 \mu\text{g/L}$) (Tablica 7). Iz rezultata je vidljivo da koncentracija heksil acetata tijekom skladištenja postepeno raste, te da temperatura skladištenja jabuka od 12°C i 20°C , najviše pogoduju razvitku heksil acetata.

S druge strane najmanja koncentracija heksil acetata od šesnaestog dana skladištenja jabuka do trideset i trećeg dana skladištenja jabuka je na temperaturi od 4°C . Koncentracija heksil acetata nakon trideset i tri dana skladištenja jabuka na 4°C iznosi ($52,5 \pm 13,4 \mu\text{g/L}$) (Tablica 11), što je za šest puta veća koncentracija od koncentracija istoga nakon trideset i trećeg dana skladištenja jabuka na temperaturi od 12°C ($338,0 \pm 82,2 \mu\text{g/L}$). Iz rezultata je vidljivo da razvitak heksil acetata skladištenjem jabuka na temperaturi od 4°C će biti puno manji nego skladištenjem jabuka na višim temperaturama.

Nakon drugog dana skladištenja identificiran je spoj 3-metilbutil acetat koji najvišu koncentraciju ima pri temperaturi skladištenja jabuka od 4°C ($16,6 \pm 1,6 \mu\text{g/L}$) (Tablica 2), dok njegova najniža koncentracija nakon drugog dana skladištenja je pri temperaturi od 20°C ($10,7 \pm 0,8 \mu\text{g/L}$). Koncentracija 3-metilbutila nakon petog dana skladištenja na temperaturi od 4°C postepeno raste ($20,6 \pm 3,3 \mu\text{g/L}$) (Tablica 2), dok koncentracija istoga nakon pet dana skladištenja na temperaturi od 20°C pada ($7,4 \pm 3,5 \mu\text{g/L}$). Dvanaestog dana skladištenja uočeno je da koncentracija 3-metilbutila kod jabuka skladištenih na 4°C se povećava te sada iznosi $24,04 \pm 6,9 \mu\text{g/L}$, s obzirom na koncentraciju 3-metilbutil acetata devetog dana skladištenja na istoj temperaturi ($14,7 \pm 3,7 \mu\text{g/L}$). koncentracija 3-metilbutil acetata se tijekom skladištenja na 4°C povećava tijekom skladištenja, dok se koncentracija istoga na temperaturi skladištenja jabuka od 20°C smanjuje.

Šesnaestog dana skladištenja jabuka na temperaturi od 20°C koncentracija 3-metilbutil acetata je iznosila $2,2 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ (Tablica 6), dok već nakon devetnaestog dana skladištenja jabuka na istoj temperaturi koncentracija je iznosila $1,5 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ (Tablica 7), što je skoro za duplo manja koncentracija od one šesnaestog dana skladištenja. Tridesetog dana skladištenja jabuka koncentracija 3-metilbutila na temperaturi od 4°C iznosila je $4,2 \pm 0,9 \mu\text{g/L}$ (Tablica 10), što je

četiri puta manje od koncentracije istoga na temperaturi skladištenja jabuka od 20⁰C gdje koncentracija 3-metilbutila iznosi 0,7±13,4 µg/L (Tablica 10).

Trideset i trećeg dana skladištenja uočava se veći razvoj koncentracije 3-metilbutila na temperaturi skladištenja jabuka od 20⁰C (4,4±0,6 µg/L) (Tablica 11) gdje se koncentracija povećala za četiri puta s obzirom na koncentraciju istoga tridesetog dana skladištenja jabuka na temperaturi od 20⁰C (0,7±13,4 µg/L) (Tablica 10). Iz rezultata se može vidjeti da razvoju estera 3-metilbutil acetata pogoduje niža temperatura skladištenja jabuka, dok manji razvoj estera je zabilježen kod viših temperatura skladištenja.

6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracija estera, etil butanoata i 3-metilbutil acetata se pri 4⁰C smanjila od prvog do zadnjeg dana skladištenja, dok koncentracija butil acetata, 2-metilbutil acetata i heksil acetata se povećala.
2. Nakon trideset i tri dana skladištenja najnižu koncentraciju 1-butanola, 1-heksanola, 2-metil-1-butanola, butil acetata, etil butanoata, 2-metilbutil acetata u heksil acetata su imale jabuke koje su bile skladištene na temperaturi od 4⁰C.
3. Najviša koncentracija 1-butanola, 1-heksanola, 2-metil-1-butanola, butil acetata, etil butanoata, 2-metilbutil acetata u heksil acetata nakon trideset i tri dana skladištenja je bila na temperaturi skladištenja jabuka od 12⁰C.
4. Najniža koncentracija 3-metilbutil acetata nakon trideset i tri dana skladištenja je bila pri temperaturi skladištenja jabuka od 12⁰C.
5. Najviša koncentracija 3-metilbutil acetata nakon trideset i tri dana skladištenja je bila pri temperaturi skladištenja jabuka od 8⁰C.
6. Temperatura skladištenja jabuka od 4⁰C smanjuje razvoj većine aromatskih spojeva, osim 3-metilbutil acetata koji pri nižim temperaturama skladištenja ima višu koncentraciju.
7. Nakon trideset i tri dana skladištenja jabuka na temperaturi od 12⁰C, dolazi do naglog povećanja koncentracije svih aromatskih spojeva osim 3-metilbutil acetata.
8. Skladištenjem jabuka do 30 dana na temperaturi od 20⁰C potaknut je ubrzani razvoj aromatskih spojeva.
9. Nakon trideset i tri dana skladištenja jabuka na temperaturi od 20⁰C koncentracija aromatskih spojeva se smanjuje.
10. Pri temperaturi od 4⁰C dolazi do usporavanja respiracije plodova, a samim time i do produženja skladišnog vijeka jabuke, dok pri temperaturi od 20⁰C, dolazi do ubrzane respiracije a time i do povećanja koncentracije aromatskih spojeva, što u konačnici rezultira smanjenjem skladištenog vijeka plodova jabuka sorte „Zlatni Delišeš“.

7. LITERATURA

1. Anonymus 1. <<http://www.horvat.hr/sortiment.php>>. Pristupljeno 20.srpnja 2017.
2. Anonymus 2. <<http://agroinfotel.net/jabuka-sorta-ajdared-i-zlatni-delises/>>. Pristupljeno 20.srpnja 2017.
3. Anonymus 3. <<http://www.tehnologijahrane.com>> Pristupljeno 5.kolovoza 2017.
4. Brackmann A., Streif R.S., Bangerth F.K., (1993), Relationship between a Reduced Aroma Production and Lipid Metabolism of Apples after Long-term Controlled-atmosphere Storage, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118(2):243-247.
5. Campeanu G., Neata G., Darjanschi G., Chemical Composition of the Fruits of Several Apple Cultivars Growth as Biological Crop, ISSN 1842-4309, 2009.
6. Dixon, J., Hewett E.W. (2010) Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A Review. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*, 28:3, 155-173.
7. El Hadi, M.A.M, Zhang, F.J., Wu, F.F., Zhou, C.H., Tao, J. (2013) Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, 18, 8200-8229.
8. Espino M. D., Roberto D.S., González G.A., Olivas G.I., Biochemistry of Apple Aroma: A Review, ISSN 1330-9862.
9. Fellman J.K., Rudello D.R., Mattinsonu D.S., Mattheis J.P., (2000), Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of 'Delicious' apple, Department of Horticulture and Landscape Architecture Washington State WA9 9164-6414.
10. Harb J., Streif R.J., Bangerth F.B., (2000), Response of Controlled Atmosphere (CA) stored "Golden Delicious" Apples to the Treatments with Alcohols and Aldehydes as Aroma Precursors, ISSN 0016-478X.

11. Lumpkin C., Fellman J.K., Rudell D.R., Mattheis J.P.,(2015), 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh) volatile production during high pCO₂ controlled atmosphere storage, Department of Horticulture, Washington State University, 100 (2015) 234–243.
12. Radenkova K. R., Radenkovs V., (2016), Assessment of shelf-life ability of apples cv.'Auksis' after long-term storage under different conditions, Institute of Horticulture, Latvia University of Agriculture Graudu Str. 1, LV-3701.
13. USDA (2012) United States Department of Agriculture. <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2122?manu=&fgcd=&ds=>> Pristupljeno 5. kolovoza 2017.
14. Yahia E. M., (1994), Apple flavor, Centro de Investigacion en Alimentacion y Desarrollo, Horticultural reviews 16:197-233.